

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－在留中国人研究者－

2011 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 李賓
指導責任者名：武田 卓
所属部署名：東北大学先進漢方 職名：准教授
治療医学講座
所在地：仙台市青葉区星陵町 1 番 1 号
電 話：022-717-7000 内線：7254



1. 助成金額： 60 万 円

2. 研究テーマ

子宮筋腫細胞増殖・線維化における、低酸素細胞内シグナル伝達機構解析

3. 成果の概要

子宮筋腫は非常に頻度が高く、多くの女性の QOL を著しく障害する。手術以外の治療としては、GnRH アゴニストによる薬物治療が行われるが、骨粗鬆症や卵巣機能欠落症状等で長期投与できない。一方、メトホルミンは糖尿病治療薬として古くより汎用され、婦人科領域では多嚢胞卵巣の排卵障害改善薬としても使用される。近年、種々の癌細胞増殖に対しメトホルミンが AMPK シグナルを介して抑制的に作用することが明らかとなり、癌治療への応用でも注目を集めている。メトホルミンの子宮筋腫細胞増殖および低酸素状態で誘導される血管新生因子である VEGF 発現に与える影響を検討した。子宮筋腫モデル細胞株である ELT-3 細胞を用いて、細胞増殖への影響を MTS アッセイで検討した。AMPK, p70S6, S6 蛋白質のリン酸化に対する効果をウエスタンブロット法で検討した。また、Cleaved PARP 抗体によるウエスタンブロット法、TUNEL 染色と Caspase-3 活性によりアポトーシスを検討した。患者検体から作

子宮筋腫細胞増殖・線維化における、低酸素細胞内シグナル伝達機構解析

メトホルミンによる子宮筋腫細胞増殖抑制効果～子宮筋腫モデル細胞株・ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討

研究者氏名 : 李 賓
中国所属機関 : 吉林大学中日聯誼病院産婦人科
日本研究機関 : 東北大学先進漢方治療医学講座
指導責任者 : 准教授 武田 卓
共同研究者名 : 築地謙治 近藤亜希子

要旨:

子宮筋腫は非常に頻度が高く、多くの女性の QOL を著しく障害する。手術以外の治療としては、GnRH アゴニストによる薬物治療が行われるが、骨粗鬆症や卵巣機能欠落症状等で長期投与できない。一方、メトホルミンは糖尿病治療薬として古くより汎用され、婦人科領域では多嚢胞卵巣の排卵障害改善薬としても使用される。近年、種々の癌細胞増殖に対しメトホルミンが AMPK シグナルを介して抑制的に作用することが明らかとなり、癌治療への応用でも注目を集めている。メトホルミンの子宮筋腫細胞増殖および低酸素状態で誘導される血管新生因子である VEGF 発現に与える影響を検討した。子宮筋腫モデル細胞株である ELT-3 細胞を用いて、細胞増殖への影響を MTS アッセイで検討した。AMPK, S6 蛋白質のリン酸化に対する効果をウエスタンブロット法で検討した。また、Cleaved PARP 抗体によるウエスタンブロット法、TUNEL 染色と Caspase-3 活性によりアポトーシスを検討した。患者検体から作製したヒト子宮筋腫モデルマウスにメトホルミンを腹腔内投与し、8 週後に摘出した組織を TUNEL 染色、Ki67 抗体および VEGF 抗体を用いた免疫染色で検討した。メトホルミンは *in vitro*・*in vivo* で子宮筋腫細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。さらに、子宮筋腫組織での VEGF の発現を低下させた。メトホルミンのこれらの効果のメカニズムとして AMPK を活性化させ、mTOR 下流の蛋白質リン酸化低下の関与が考えられた。子宮筋腫治療における細胞増殖抑制・血管新生抑制効果からのメトホルミンの治療効果が期待される。

Key Words 子宮筋腫、メトホルミン、AMPK、NOG マウス、VEGF

緒言:

子宮筋腫は、子宮の筋層に発生する平滑筋細胞由来の良性腫瘍である。生殖年齢の女性のうち 20% の割合で発生する。これらの腫瘍は閉経前の女性の子宮摘出の一番の適応となり、米国での一年間での子宮摘出の 33% を占める (1, 2)。一方メトホルミンは、タイプ II 糖尿病の治療において広く使われている薬剤である。メトホルミンは糖尿病患者における乳癌発症抑制効果が報告されたことから、癌治療領域においても注目を集めている。乳がん細胞における研究では、メトホルミンは AMPK (AMP-activated protein kinase) をリン酸化し mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路を抑制し、その下流にある S6 蛋白質のリン酸化を抑制し細胞増殖・タンパク質合成を抑制することが示されている。これよりメトホルミンは、他のがんや良性腫瘍の増殖を抑制する可能性が考えられる (3, 4)。子宮筋腫モデル細胞株の ELT3 細胞、子宮筋腫モデルラット Eker rat での筋腫増殖での mTOR シグナルの重要性が報告されていることから、メトホルミンによる子宮筋腫増殖抑制効果が期待される。

子宮筋腫研究が進まない大きな原因の 1 つは、良い生体内モデルシステムの欠如であるが、我々は免疫不全マウスに手術にて摘出した子宮筋腫組織を移植したヒト子宮筋腫モデルを開発した (NOD/SCID/ γ c-null : NOG) (5)。*In vitro* での検討に加えてこのモデルを使用して、メトホルミン投与が子宮筋腫増殖におよぼす *in vivo* での影響を検討した。子宮筋腫には VEGF が高発現しており、子宮筋腫の病態における VEGF の関与が考えられるが (6)、低酸素誘導性の転写因子である HIF-1 の制御を介して VEGF は mTOR の下流にある。メトホ

ルミンによる mTOR シグナル抑制からの VEGF 発現抑制効果も期待できる。

対象と方法:

1) 子宮筋腫細胞増殖に対するメトホルミンによる抑制効果の in vitro での検討

- ・子宮筋腫細胞株である ELT-3 細胞、UtLM 細胞を実験に用いた。
- ・MTS アッセイを用いて細胞増殖を検討した。
- ・アポトーシスの関与を cleaved PARP の発現、および TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色で評価した。
- ・mTOR シグナル伝達経路下流のタンパク質のリン酸化抗体を使用した Western blotting を検討した。

2) 子宮筋腫細胞増殖に対するメトホルミンによる抑制効果の in vivo での検討

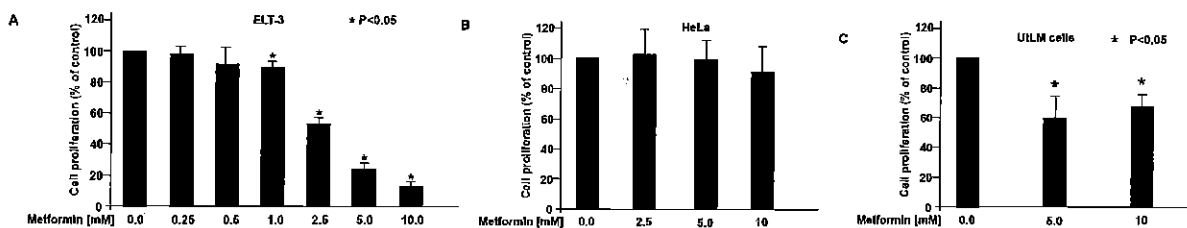
- ・ヒト子宮筋腫をヌードマウスに移植した子宮筋腫モデルマウスを作製した。
- ・子宮筋腫モデルマウスにメトホルミンを経口投与し、腫瘍サイズの変化を経時的に測定した。これより摘出した組織を用いて、細胞増殖・血管新生・アポトーシスをタネル染色、Ki-67・VEGF 抗体を用いた免疫染色で、mTOR シグナルへの抑制効果をリン酸化 S6 抗体を用いた免疫染色で検討した。

結果:

1. メトホルミンは子宮筋腫細胞増殖を抑えた。

メトホルミンは、ELT-3 細胞 (Fig. 1A) において、増殖を抑えることを示した。Dose-response は、ELT-3 細胞の増殖がメトホルミンによって 1mM から増殖を抑えることを示した。LKB1 は、AMPK のメトホルミンによって活性化されるキナーゼであるが、LKB1 を欠損した HeLa 細胞ではメトホルミンによって増殖を抑制しなかった (Fig. 1B)。ヒト平滑筋腫細胞 (UtLM) (Fig. 1C) でも同様にメトホルミンは増殖を抑制した。

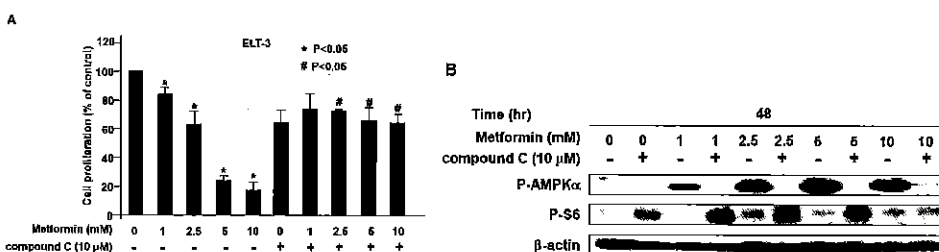
Fig. 1



2. AMPK に対する compound C は、メトホルミンの抑制作用から細胞を rescue した。

AMPK が ELT-3 細胞でメトホルミンの増殖抑制作用することに関係していることを確認するため、compound C (AMPK の抑制剤) を使用した。Fig. 2A で示すように、compound C を加えると、MTS アッセイによってメトホルミンで増殖を抑えた細胞を rescue した。compound C は、メトホルミンによりリン酸化された AMPK を抑制し、S6 (Ser^{235/236}) のリン酸化を活性化した。

Fig. 2



3. ELT-3 細胞はメトホルミンによってアポトーシスが誘導される。

メトホルミンが ELT-3 細胞でプロアポトーシスを誘導するかを調べた (7, 8)。Fig. 3A で示すように、メトホルミンは 2.5mM から 10mM に PARP を増加した。Fig. 3B は、compound C を加えると cleaved-PARP を低下させ

ることを示した。TUNEL 染色では、メトホルミンによりアポトーシス (DNA 断片化) が起こることが示された (Fig. 4)。

Fig. 3

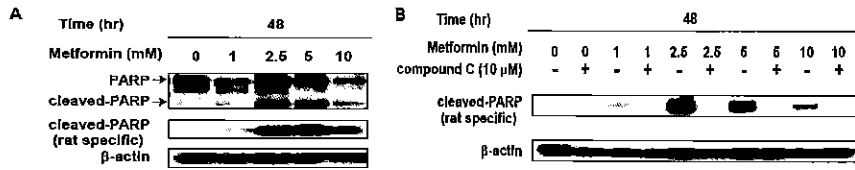
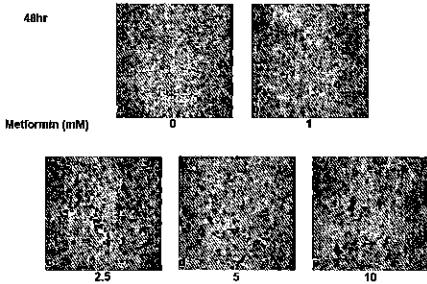


Fig. 4



4. In vivo の検討でも、メトホルミンはアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制した。

メトホルミンは増殖を妨げて、生体内で平滑筋腫細胞のアポトーシスを誘発した。メトホルミン治療の生体内有効性を測定するために、ヒトの子宮筋腫モデルマウスを使用した。免疫染色は、8 週間のメトホルミン治療が Ki-67 レベル (Fig. 5) の抑制を引き起こすことを示した。また、TUNEL 染色の結果は、8 週間のメトホルミン治療によりアポトーシスが起こることを示した (Fig. 6)。mTOR の活性化の指標として、そのシグナルの下流にあるリン酸化 S6 (Ser^{235/236}) を免疫染色で確認した。8 週間のメトホルミン治療はリン酸化 S6 (Ser^{235/236}) レベル (Fig. 7C) を抑制することを認めた。さらに、子宮筋腫組織での VEGF の発現を低下させた (Fig. 8)。

Fig. 5

Fig. 6

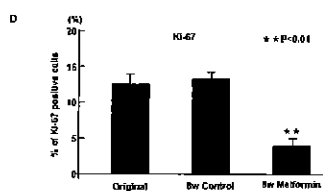
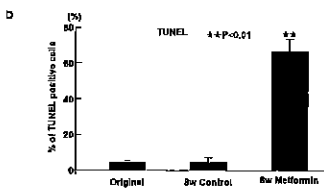
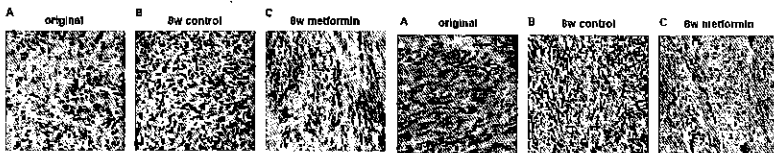
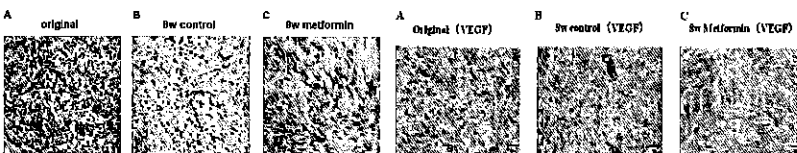


Fig. 7

Fig. 8



考察:

近年、種々の癌細胞増殖に対しメトホルミンが AMPK シグナルを介して抑制的に作用することが明らかとなり、癌治療への応用でも注目を集めている。メトホルミンはすでに乳がん、前立腺がん、大腸癌、卵巣がん (3、9、

10) で細胞増殖を抑えることが示されているが、今回の実験は、子宮筋腫細胞でメトホルミンの抗腫瘍を *in vitro*・*in vivo* で示した最初の研究である。

メトホルミンによるガン細胞増殖抑制研究において、AMPK/mTOR 経路は、代謝とタンパク質合成(11)の中心的な役割を演じます。compound C (AMPK の抑制剤) を使用した実験結果からも、子宮筋腫においてもメトホルミンが AMPK/mTOR 経路に作用して増殖抑制することが示された。

従来は AMPK が複合体 (TSC2) (mTOR シグナリングを関する TSC1/TSC2 (hamartin/tuberin) のサブユニット) のリン酸化を通して mTOR を抑制して細胞増殖を抑制するとされていた。今回の研究においては、TSC2^{-/-}である ELT-3 細胞を使用していることから TSC2 のリン酸化の他に、AMPK は mTOR シグナリングの未知の抑制メカニズムがあると考えられる。

今回の研究においてヒトの子宮筋腫モデルマウスで *in vivo* の検討を行った。メトホルミンは、モデルマウスに対する毒性なしで子宮筋腫組織の発達を抑えた。さらに、実際の臨床では、メトホルミンは多嚢胞卵巣症候群 (PCOS) の治療において広く処方されている。多くのレポートは、PCOS (12) で、メトホルミンの治療的な有用性を支持する。これより、生殖年齢女性でのメトホルミンの長期使用は、比較的安全であると考えられる。

メトホルミンのこれらの効果のメカニズムとして AMPK を活性化させ、mTOR 下流の蛋白質リン酸化低下の関与が考えられた。子宮筋腫治療における細胞増殖抑制・血管新生抑制効果からのメトホルミンの治療効果が期待される。

参考文献:

1. Cramer SF, Patel A 1990 The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 94:435 - 438
2. Wilcox LS, Koonin LM, Pokras R, Strauss LT, Xia Z, Peterson HB 1994 Hysterectomy in the United States, 1988 - 1990. *Obstet Gynecol* 83:549 - 555
3. Osborne CK, Bolan G, Monaco ME, Lippman ME 1976 Hormone responsive human breast cancer in longterm tissue culture: effect of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4536 - 4540
4. Belfiore A 2007 The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des* 13:671 - 686
5. Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N 2010 Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice. *Tohoku J Exp Med* 222(1):55-61
6. Takeda T, Osuga K, Miyake A, Wakabayashi A, Morishige K, Kimura T 2008 Elevated level of plasma vascular endothelial growth factor after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for leiomyomata. *Gynecol Endocrinol* 24:724-726
7. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE, Thor AD 2009 Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* 8:2031 - 2040
8. Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM 2008 Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 14:7192 - 7198
9. Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN 2008 The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila)* 1:369 - 375
10. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, Bruchim I 2008 In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 14 110:246 - 250
11. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F 2010 Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther* 9:1092-1099
12. Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F Jr 2009 Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev* 30:1-50

作成日: 2011 年 3 月 24 日